

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI**  
**FAKULTA TEXTILNÍ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Liberec 2012

Aneta Hniličková

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI**

**FAKULTA TEXTILNÍ**



Studijní program: B3107 Textil

Studijní obor: Textilní marketing a technologie

**Vývoj a testování biodegradability nanovláknenných nosičů  
pro tkáňové inženýrství**

**Development and biodegradability testing of nanofibrous  
scaffold for tissue engineering**

Aneta Hniličková

KTT

**Vedoucí bakalářské práce:** Mgr. Jana Voříšková

**Rozsah práce:**

Počet stran textu ...41

Počet obrázků .....14

Počet tabulek .....9

Počet grafů.....2

Počet stran příloh..25

Zadání bakalářské práce

(vložit

originál)

## **Prohlášení**

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum

Podpis

V Liberci dne 3.5.2012

.....

Podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych tímto poděkovat paní Mgr. Janě Voříškové za pomoc a ochotu při vypracování bakalářské práce. Děkuji také panu Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. a panu Prof. RNDr. Davidu Lukášovi, CSc. za odborné konzultace. Děkuji i paní Ing. Denise Zálešákové za snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. Ráda bych také poděkovala svému příteli Pavlu Horákovi a rodině za trpělivost a podporu.

## ANOTACE

Tkáňové scaffoldy tvoří podpůrnou strukturu pro uměle pěstované tkáně používané jako biologické náhrady v oboru tkáňového inženýrství. Tyto scaffoldy mohou sloužit jako biologické náhrady poškozených tkání. Důležitou vlastností tkáňových nosičů je jejich biodegradace, během které se mění některé parametry scaffoldu. Současný výzkum je proto zaměřen na vývoj ideálních biokompatibilních scaffoldů, které by umožnily předpovídat jejich degradaci a zamezily by tak nežádoucím vedlejším účinkům po jejich implantaci *in vivo*.

Teoretická část se zabývá literární rešerší výroby nanovláknenných scaffoldů, mechanismem degradace alifatických polyesterů a možnostmi urychlení degradačního procesu.

Hlavním cílem experimentální části je vytvoření pracovního protokolu pro testování degradace. Byly vyvinuty laboratorní techniky pro zachování sterilních podmínek, určení vhodných inkubačních intervalů a testování vhodnosti vybraných metod určující proces biodegradace PCL nanovláknenných scaffoldů *in vitro*.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Biodegradace, hydrolýza, PCL, nanovláknenné scaffoldy.

## ANNOTATION jiný překlad

Scaffolds used in the field of tissue engineering create a support structure for artificially grown cells. These scaffolds can serve as the biological replacements of damaged tissues. One of the important requirements of scaffolds is its biodegradation. During the degradation process some parameters of scaffold are changing. The goal of contemporary research is the development of ideally biocompatible scaffold that would determine in advance the level of its degradation *in vivo* and prevent any unwanted side effects after implantation.

Theoretical part reviews production of nanofibrous PCL scaffold, degradation mechanisms of aliphatic polyesters and possible acceleration of the degradation process.

The main goal of the experimental part is creating the processing protocol of degradation testing. Laboratory procedure for preservation of sterile conditions, determination of suitable incubation intervals and suitability testing of selected methods determining the process of biodegradation of PCL nanofibrous scaffolds *in vitro* were developed.

**KEY WORDS:** Biodegradation, hydrolysis, PCL, nanofibrous scaffolds.

## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část .....	10
2.1 Tkáňové inženýrství.....	10
2.2 Nanovláknenné scaffoldy pro tkáňové inženýrství.....	11
2.2.1 Techniky výroby nanovláknenných scaffoldů .....	12
2.3 Biodegradabilita syntetických nanovláknenných scaffoldů .....	14
2.3.1 Hydrolýza alifatických polyesterů .....	15
2.3.2 Mechanismus degradace alifatických polyesterů .....	17
2.4 Modifikace scaffoldů pro urychlení biodegradace .....	20
2.4.1 Ošetření netermálním plazmatem .....	20
2.4.2 Změna pH prostředí .....	22
2.4.3 Kombinace syntetických a přírodních polymerů .....	22
2.5 Metody analýzy degradace nanovláknenných scaffoldů .....	22
2.5.1 Hmotnostní změny scaffoldu .....	23
2.5.2 Změny pH inkubačního roztoku .....	23
2.5.3 Morfologické změny struktury (SEM) .....	23
3. Experimentální část.....	24
3.1 Použitý materiál a přístroje .....	25
3.2 Výroba PCL nanovláknenných scaffoldů .....	25
3.2.1 Elektrospinning .....	26
3.2.2 PCL nanovláknenné scaffoldy modifikované NVP .....	26
3.3 Příprava scaffoldů před inkubací .....	27
3.3.1 Testování kultivačních nádob .....	27
3.3.2 Průběh přípravy vzorků .....	27
3.4 Analýza degradace PCL nanovláknenných scaffoldů .....	28
3.4.1 Vymývání a sušení vzorků.....	28
3.4.2 Změny pH inkubačního roztoku .....	29
3.4.3 Hmotnostní změny PCL nanovláknenného scaffoldu .....	29
3.4.4 Analýza morfologických změn PCL nanovláknenného scaffoldu .....	29

4. Výsledky .....	31
4.1 Vliv výrobní technologie na PCL nanovláknenné scaffoldy .....	32
4.1.1 Elektrospinning .....	32
4.1.2 PCL nanovláknenné scaffoldy modifikované NVP .....	32
4.2 Příprava inkubačního procesu .....	33
4.3 Analýza degradace PCL nanovláknenných scaffoldů .....	34
4.3.1 Vymývání a sušení vzorků .....	34
4.3.2 Změny pH inkubačního roztoku .....	35
4.3.3 Hmotnostní změny PCL nanovláknenného scaffoldu .....	35
4.3.4 Analýza morfologických změn PCL nanovláknenných scaffoldů .....	35
5. Závěr .....	37
Seznam literatury .....	39
Seznam termínů a zkratk .....	41
Seznam obrázků .....	42
Seznam tabulek .....	42
Seznam grafů .....	43
Seznam příloh .....	43



## 1. ÚVOD

Tkáňové inženýrství využívá znalostí přírodních věd k vývoji biologických náhrad. Hlavním cílem tohoto vědního oboru je co nejdokonalejší imitace přírodních procesů, které jsou organismu vlastní. Základní strukturou umožňující buněčnou podporu při růstu a tvarování nové tkáně biologické náhrady je tkáňový nosič neboli scaffold. Na tomto podpurném skeletu je možné vytvořit implantáty, které byly vypěstovány z části zdravých buněk odebraných přímo od pacienta.

Scaffold, který je součástí implantátu, může být vyroben různými technikami z přírodních nebo syntetických polymerů. Musí však být známy podmínky jeho degradace. Jedním z úkolů tkáňového inženýrství je předem určit změny, kterými bude implantát procházet v daném časovém horizontu a specifikovat vedlejší produkty, které budou uvolňovány vlivem prostředí lidského těla.

Tato bakalářská práce si klade za cíl vypracování teoretické rešerše popisující možnosti výroby nanovláknenného scaffoldu a degradační vlastnosti biodegradovatelných polymerů vhodných pro výrobu scaffoldů. Účelem experimentální části je příprava a vypracování metodiky laboratorního testování degradace nanovláknenných tkáňových scaffoldů *in vitro* pro nové biologické laboratoře Fakulty textilní TU Liberec.

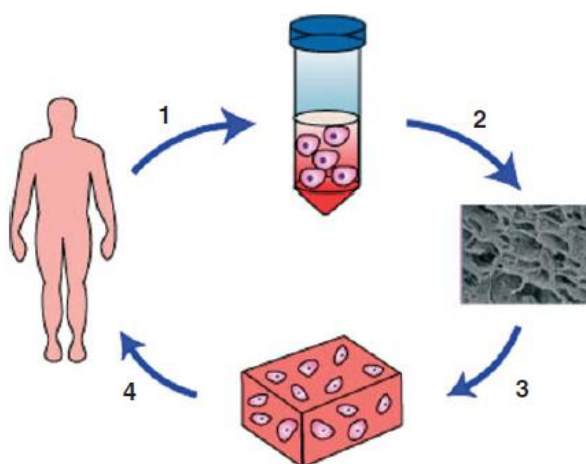
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární vědecká oblast využívající znalostí inženýrství a přírodních věd, které vedou k vývoji nových možností regenerace tkání. Tkáňové inženýrství je odvětvím biomedicíny, které se zabývá obnovou, podporou nebo zlepšením funkcí orgánů. Zpravidla zahrnuje odběr zdravých buněk pacienta a poté následuje jejich množení *in vitro* [1].

Jedním z hlavních cílů tkáňového inženýrství je výroba 3D nanovláknenných struktur napodobujících ECM, kterou kolem sebe tvoří buňky pojivových tkání. ECM se skládá z proteinů (zejména kolagen), z glykosaminoglykanů (proteoglykanů) a glykoproteinů (laminin, fibronectin) přispívajících k vazbě buněk na vláknité složky vaziva [17].

Uměle vyrobené scaffoldy po osazení buněčnými kulturami zajišťují podporu při růstu tkáně, podléhají biologické degradaci v organismu, postupně uvolňují prostor nové tkáni a buňkami nově produkované ECM [1].



Obrázek 1\_ Schéma znázorňující izolaci kmenových buněk, kultivaci buněk *in vitro* na vhodném scaffoldu a implantaci *in vivo* [27].

## 2.2 Nanovláknenné scaffoldy pro tkáňové inženýrství

Nanovláknenný scaffold tvoří porézní podpůrnou strukturu, která umožňuje růst buněk a jejich migraci z vnějšku dovnitř scaffoldu (tj. proliferace) [3]. Díky scaffoldům je umožněn řízený růst nových orgánů, které nemusí být odebrány dárci. Pěstování náhrad lidských orgánů bylo podmíněno právě nedostatkem dárců [4].

Scaffoldy jsou 3D struktury, které napomáhají procesům jako je např.: buněčná adheze, proliferace, diferenciaci, vylučování ECM a formace nové tkáně. Scaffold může mít stálý nebo dočasný charakter, což závisí na aplikaci a funkci nové tkáně. Dočasné scaffoldy jsou vyrobené z biodegradovatelných polymerů, které *in vivo* podléhají úplné degradaci a zanechávají pouze novou tkáň. Permanentní scaffoldy zůstávají v těle s vrostlými tkáněmi a skládají se z polymerního/biologického kompozitu [4].

Tabulka 1\_Ideální vlastnosti scaffoldu pro tkáňové inženýrství [4].

Funkce scaffoldu	Konstrukční parametry scaffoldu
Zamezení zánětlivých nebo toxických reakcí v organismu.	Biokompatibilita, netoxičnost, nekarcinogenost.
Podpora 3D růstu tkání a orgánů.	3D specifický tvar scaffoldu.
Podpora rovnoměrného růstu nasazených buněk.	Vysoká porozita a propojení mezi póry.
Tvorba vhodného povrchu pro buněčnou adhezi, proliferaci a migraci.	Optimální chemické složení a povrch scaffoldu.
Umožnit interakce s povrchem stejně tak jako spojení s okolními buňkami.	Velký specifický povrch.
Přímá orientace buněk.	Vhodná orientace vláken uvnitř scaffoldu, chemická úprava povrchu.
Podpora proliferace a migrace vedoucí k prorůstání celým scaffoldem.	Optimální velikost pórů umožňující penetraci, s vysokou porózitou a častým spojením pórů.
Umožnit tvarem struktury průchod živin a zároveň i odpadních látek ven ze scaffoldu.	Vysoká porozita a propojení mezi póry.
Degradace scaffoldu a následný růst buněk.	Rychlost degradace by měla odpovídat růstu a formování tkáně. Produkty polymerní degradace nesmí být toxické ani podporovat záněty v prostředí organismu.
Tvorba struktury, která si v organismu zachová dostatečnou mechanickou pevnost.	Scaffold by měl mít podobné mechanické vlastnosti jako rostoucí tkáň.

### 2.2.1 Techniky výroby nanovláknenných scaffoldů

Napodobování struktury ECM je jedním z hlavních cílů tkáňového inženýrství. Mezi všemi použitými technikami přípravy ECM syntetickou cestou se techniky tvořící nanovláknena ukázaly jako nejvíce vyhovující. Nejběžnější techniky zvlákňování polymerů jsou: elektrospinning, samosestavování (self - assembly) a fázová separace (phase separation). Zejména elektrospinning je široce studovanou technikou s velmi slibnými výsledky [5].

3D biodegradovatelné nanovláknenné scaffoldy odpovídají strukturou ECM a jsou vhodné pro buněčnou proliferaci a adhezi. Proto mohou být nanovláknena bez ohledu na výrobní metodu použita jako scaffold například pro muskuloskeletární odvětví tkáňového inženýrství (např. kosti, chrupavky, vazy a kosterní svaly), kožní a vaskulární tkáňové inženýrství či jako nosiče kontrolovaně uvolňující léčiva nebo proteiny [5].

#### Self - assembly

Je souhrnným názvem pro více technik založených na principu spojení a uspořádání menších molekul jakožto základních stavebních bloků pro větší objekty. Hlavní mechanismus self – assembly je založen na intermolekulárních silách, které spojují menší jednotky dohromady a zároveň tvar těchto jednotek udává celkovou strukturu makromolekulárního nanovláknena [10].

#### Phase separation

První fází této technologie je rozpouštění polymeru, poté dochází k separačnímu dělení fází kapalina – kapalina. Následuje polymerní želatinace, která umožňuje udržení pórovitosti scaffoldu za nízkých teplot a vymytí rozpouštědla z gelu vodou. Poslední fází je zmrazení a sublimační vysoušení ve vakuu. Touto technologií je možné získat vlákna o průměru 50 – 500 nm [5].

#### Elektrospinning

Proces elektrostatického zvlákňování může probíhat několika způsoby např. zvlákňování z volné hladiny, z kapiláry nebo z válečku. Pokud je nutné elektrospinning využívat k vyšší výrobní produkci, je třeba využít technologického způsobu, který umožňuje odpovídající rychlost výroby. Proto se v poslední době klade velký důraz na

výzkum zvlákňování nanovláknenných vrstev technikou elektrostatického zvlákňování z válečku, kterou je možné zvýšit produkci nanovláknenných vrstev [1].

Metodou elektrosponingu je vytvořena netkaná textilie, jejíž struktura se skládá z náhodně uspořádaných polymerních vláken. Touto technikou je možné zvlákňovat některé přírodní nebo syntetické polymery. Průměry vláken se mohou pohybovat v rozsahu od několika desítek nanometrů až po vlákna v řádu mikrometrů.

Velký specifický povrch a vysoká porozita umožňují podporu buněčné interakce, z tohoto důvodu mají nanovláknna velký potenciál při využití ve tkáňovém inženýrství. V procesu elektrostatického zvlákňování dosahují vlákna průměru 50 – 1000 nm ale i více [5].

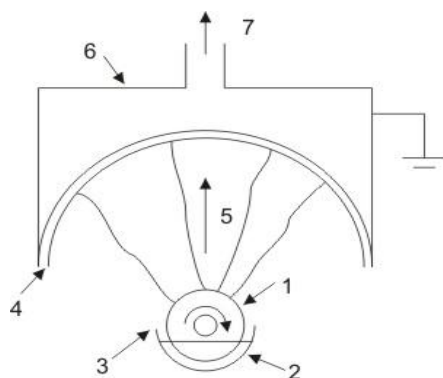
### Rozdělení polymerů zvlákňitelných elektrosponingem

#### a) Přírodní polymery:

Kolagen, želatina, chitosan, kyselina hyaluronová, fibroin.

#### b) Syntetické polymery:

Kyselina polylaktidová, glykolová a kopolymery předchozích dvou, tj. kyselina polylaktid –glykolová, polykaprolakton, polyurethan, polyethylen – vinylacetát [5].



Obrázek 2\_Schéma zvlákňování z válečku: 1 - rotující kovový válec spojený se zdrojem napětí, 2 - zvlákňovací roztok, 3 – zásobní nádoba, 4 – nosná vrstva, 5 – směr tvorby nanovláken, 6 – uzemněná sběrná clona, 7 – odsávání vzduchu [20].

## 2.3 Biodegradabilita syntetických nanovlákných scaffoldů

Degradační vlastnosti polymerů hrají klíčovou roli při výběru materiálu a konstrukci scaffoldů vhodných pro použití ve tkáňovém inženýrství. Hlavním důvodem je nutnost zajištění mechanické pevnosti scaffoldů do takové míry, aby byly schopny odolávat biologickým silám při *in vivo* implantaci, umožnily buňkám produkci ECM a napomáhaly dalším biologickým procesům, které jsou nezbytné pro úspěšný růst tkání. Rychlost degradace nanovlákných scaffoldů by měla odpovídat rychlosti růstu tkáně. Rychlejší degradace může vést ke snížení funkčních vlastností tkání, zatímco pomalá degradace může bránit růstu tkáně a způsobit tvorbu jizev [8].

Většina syntetických biodegradovatelných polymerních scaffoldů patří do skupiny polyesterů. Nevýhody těchto polymerů v aplikacích tkáňového inženýrství mohou být například: uvolňování kyselých degradačních látek, rychlá ztráta mechanických vlastností během degradace a horší biokompatibilita oproti přírodním materiálům. Naopak jako hlavní výhoda se u polyesterů uvádí dosažení klidné degradace hydrolýzou esterových vazeb a schopnosti vstřebání degradačních produktů metabolickou cestou [6].

Biodegradovatelné polymery nemusí být nutně biologicky vstřebatelné, tedy během rozpadu, kdy se jednotlivé části pohybují z místa účinku *in vivo*, není vyžadováno, aby vymizely z těla. Schopnost vstřebatelnosti při použití *in vivo* je důležitá u implantátů, které není možné z těla vyjmout [12].

Tabulka 2\_Definice biodegradovatelnosti, biologické vstřebatelnosti, bioabsorbce a bioeroze [12].

<p><b>Biodegradace:</b></p> <p>Biodegradovatelné jsou pevné polymerní materiály a zařízení, které se rozkládají v důsledku degradace makromolekulární disperze <i>in vivo</i> bez zjevných stop ukazujících na jejich eliminaci z těla. Biodegradovatelné polymerní systémy nebo zařízení mohou být napadeny biologickými složkami tak, že je celistvost systému či makromolekul samotných ovlivněna a rozdělena na fragmenty nebo jiné vedlejší produkty degradace. Takové fragmenty se mohou vzdálit od místa výskytu, ale nemusí vymizet z těla.</p>
<p><b>Bioresorbce (biologická vstřebatelnost):</b></p> <p>Biologicky vstřebatelné jsou pevné polymerní materiály a zařízení, které vykazují objemovou degradaci a nadále se vstřebávají <i>in vivo</i>, tj. polymery, které jsou eliminovány přírodními cestami, a to jednoduchou filtrací vedlejších produktů</p>

degradace nebo následkem jejich metabolizace. Bioresorbce je tedy koncept zahrnující totální odstranění cizího materiálu a objemovou degradaci vedlejších produktů (látky s nízkou molekulární hmotností) bez vedlejších účinků. Bioresorbce předpokládá kompletní odstranění.

**Bioeroze:**

Bioerodovatelné polymery jsou pevné polymerní materiály nebo zařízení, které vykazují povrchovou degradaci a také vstřebatelnost *in vivo*. Bioeroze je koncept zahrnující také totální odstranění cizího materiálu a povrchovou degradaci vedlejších produktů (látky s nízkou molekulární hmotností) bez vedlejších účinků.

**Bioresorbce:**

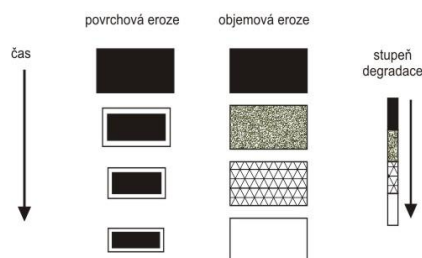
Bioabsorbovatelné jsou pevné polymerní materiály nebo přístroje, které mohou být absorbovány v tělních tekutinách bez rozštěpení polymerního řetězce nebo úbytku molekulární hmotnosti. Příkladem je proces pomalého rozkladu vodou rozpustných implantátů v lidském těle. Bioabsorbovatelné polymery mohou být bioresorbovány po vyloučení dispergovaných makromolekul.

### 2.3.1 Hydrolýza alifatických polyesterů.

Polyestery, jejichž charakteristickou skupinou je esterová vazba - CO(O)-, můžeme rozdělit na aromatické, jako např. polyethyltereftalát (PET), které jsou díky benzenovému jádru poměrně odolné biodegradaci a některým rozpouštědlům [10], a alifatické polyestery jako např.  $\text{CH}_4$  nebo PCL, jejichž schopnost biodegradace splňuje požadavky medicínských aplikací [15]. Hlavním důvodem je citlivost alifatických polyesterů na hydrolytické nebo enzymatické štěpení polymerního řetězce vedoucí k  $\alpha$ -hydroxy kyselinám, které jsou v lidském těle přirozeně metabolizovány [14].

Alifatické polyestery jsou používány v oblasti medicíny nejčastěji pro dočasné mechanické podpory a v regenerativní medicíně [10]. Mezi alifatické polyestery patří například PGA a PLA. Obě kyseliny spolu mohou vytvářet kopolymer tj. kyselina polylaktidová – glykolová (PLGA). Obě tyto kyseliny mohou být vyrobeny z monomerů vyskytujících se v přírodě, ale i z minerálních zdrojů. Dalším polymerem této skupiny je polykaprolakton (PCL) [14].

Heterogenní neboli povrchová eroze, kdy se vyskytuje hydrolýza pouze na povrchu, je prvním krokem k celkové degradaci polymeru. Je narušena vnější vrstva materiálu a hlubší hydrolytický rozklad pokračuje až poté, co je porušená vrstva odstraněna do okolního prostředí. Eroze může být odhadována měřením mechanické pevnosti a poklesem molekulové hmotnosti. Kompletní rozložení polymeru však trvá podstatně déle než například ztráta pevnosti v tahu [10].



Obrázek 3\_Schematické znázornění průběhu povrchové a objemové eroze polymerní matrix [10].

Struktura nanovlákněné vrstvy umožňuje díky velkému specifickému povrchu rychlou difúzi vody. Rovnoměrnost difúze je dána homogenitou vlákněné vrstvy. Lze předpokládat, že voda pronikne celým objemem vrstvy polymeru téměř okamžitě na začátku degradace. Hydrolyzou také dochází k úbytku molekulární hmotnosti, zhoršení mechanických vlastností a váhovému úbytku v celém objemu současně. V těchto případech je tedy vodní difúze rychlejší než hydrolyza. Hmotnostní úbytek je znázorněn rovnicí (1).

$$m_w = 100 \cdot \frac{m_{wr} - m_{ws}}{m_{wr}}, \quad (1)$$

kde  $m_{wr}$  je váha vzorku před nabobtnáním a  $m_{ws}$  je váha vzorku po nabobtnání [10].

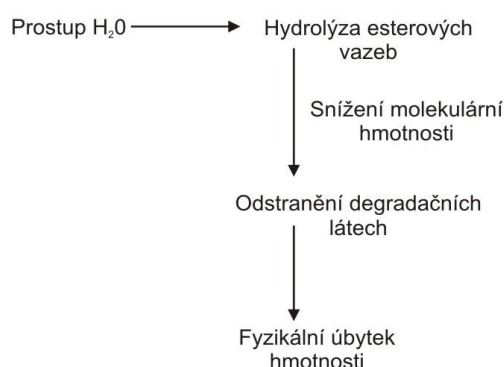
Esterové skupiny mohou být snadno hydrolyzovány, což vede k rozštěpení polymerního řetězce. Obecným důsledkem je snížení odolnosti plasticko – elastické deformace neboli zvýšení křehkosti polymeru. Esterová hydrolyza může být katalyzována kyselé či zásaditě. Každá molekula polymeru s vlastní karboxylovou a alkoholovou koncovou skupinou je rozdělena na dvě části, náhodně ve středu v dané esterové skupině. Počet karboxylových koncových skupin se tak v čase zvyšuje, zatímco jsou molekuly děleny hydrolyzou. Proces hydrolyzy z hlediska rychlosti tvorby karboxylových skupin je popsán rovnicí (2) [10].

$$\frac{dC}{dt} = kEwC = u_m C, \quad (2)$$

kde  $E, C$  a  $w$  jsou koncentrace esterových skupin, karboxylových skupin a vody v polymerní matrixi,  $k$  je kinetická konstanta hydrolyzy a  $u_m$  stupeň hydrolyzy za předpokladu, že  $E$  a  $w$  jsou konstanty v počátečních fázích procesu. Kinetická konstanta hydrolyzy je termodynamická veličina spojená s pravděpodobností molekulárního štěpení, které závisí na teplotě, zatížení materiálu a pH vodných médií. Dalším předpokladem je rovnoměrné rozložení objemu vody ve vzorku [10].



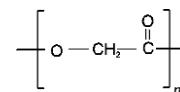
Během první fáze proniká vodný roztok do polymeru. Následuje degradace hydrolytickou reakcí převádějící dlouhý polymerní řetězec do kratších ve vodě rozpustných fragmentů. Rychlost hydrolýzy je ovlivněna velikostí a tvarem degradovaného vzorku, molekulární hmotností, strukturou, krystalinitou polymeru, sterilitou prostředí, degradačním médiem, jeho teplotou a pH [8]. Dále degradaci ovlivňuje molekulární struktura, hustota esterových skupin, typ degradačního média, mechanické stimuly a doba inkubace. Jedním z významných faktorů je stupeň krystalinity, protože krystalické části méně propouštějí vodu, což zpomaluje hydrolýzu polymeru. Tento jev je důvodem vyššího procentuálního úbytku amorfni části polymeru při degradaci hydrolýzou [10].



Obrázek 4\_Illustrativní mechanismus degradace polymerních esterů [8].

### 2.3.2 Mechanismus degradace alifatických polyesterů

Typ polymeru a způsob výroby scaffoldu je nutné přizpůsobit použití *in vivo*. Určení ideálního polymeru pro danou biologickou náhradu vyžaduje znalosti základních vlastností polymerů, které jsou nezbytné pro teoretickou úvahu o průběhu biodegradace.



#### Kyselina polyglykolová (PGA)

PGA je biodegradovatelný, termoplastický materiál s vysokou krystalinitou 46-50%, teplotou skelného přechodu kolem 36°C a teplotou tání kolem 225°C [6]. Hodnota modulu tahu pro PGA je 7,0 GPa [6, 7].

#### Nejčastější aplikace PGA

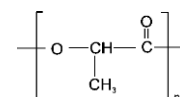
Vstřebatelné chirurgické nitě, náhrady menisku, kapsle pro postupné uvolňování léčiv [7].

### Degradační proces PGA

Rychlost degradace: 3 – 4 měsíce [7] v závislosti na stupni krystalinity, molekulové hmotnosti, tvaru a místu implantace.

V první fázi dochází k difúzi vody do amorfních částí polymerní matrice a k hydrolyze polymerního řetězce. V druhé fázi degradují krystalické oblasti polymeru, které po degradaci amorfních částí procentuálně převládají. Dle studie *Pathiraja A. Gunatillake (2003)* první fáze nastává po 21 dnech a následujících 28 dní degraduje krystalická oblast [6].

V závěru procesu biodegradace *in vivo* dochází k přeměně kyseliny glykolové na oxid uhličitý a vodu. Tyto dvě složky jsou vyloučeny z těla dýchacím ústrojím. Přestože produkt degradace, tedy kyselina glykolová je v organismu vstřebatelná ve vysokých koncentracích, může lokálně zvýšená koncentrace způsobit poškození tkáně. Proto je PGA ve většině případů používána do kopolymeru například s PLA nebo PVA [6].



### **Kyselina polylaktidová (PLA)**

PLA je biodegradovatelný polymer vyskytující se ve třech izomerních formách chirálního uspořádání: **D** (-), **L** (+) - hodnota modulu tahu 2,7 GPa a **D**, **L** - hodnota modulu tahu 2,0 GPa [6, 7]. **L** – PLA a **D** – PLA jsou semi - krystalické látky, s obdobnými stupni hydrolytické degradace jako PGA [6].

PLA je možné získat jak z přírodních zdrojů, tak i jako ropný produkt. Pro většinu aplikací je používán **L** izomer kyseliny mléčné, protože je v těle metabolizován přednostně [6]. **L** – PLA je termoplastický polymer s obsahem krystalické části kolem 37%, teplotou skelného přechodu 60 – 65°C a teplotou tání v rozmezí 173 – 178°C. **L** - PLA je více hydrofobní než PGA [18,7].

### Nejčastější aplikace PLA

Kontrolované uvolňování léčiv, chirurgické a ortopedické pomůcky [14], fixace zlomenin, meniskové náhrady [7].

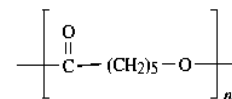
### Degradační proces

Rychlost degradace: 10 měsíců – 4 roky v závislosti na stupni krystalinity, molekulové hmotnosti, tvaru a místu implantace [10].

**L** - PLA degraduje náhodnou hydrolyzou esterových vazeb na kyselinu mléčnou, která se běžně vyskytuje v lidském těle. Tato kyselina v konečné fázi degradace vstupuje do citrátového cyklu a je vylučována jako H<sub>2</sub>O a CO<sub>2</sub>. Nebyla objevena

významná akumulace degradačních produktů L - PLA v životně důležitých orgánech [6]. L - PLA je často kombinovaná s PCL, které má taktéž nízký stupeň degradace nebo s PGA [10].

### Kopolymer kyseliny polymléčné – glykolové (PLGA)



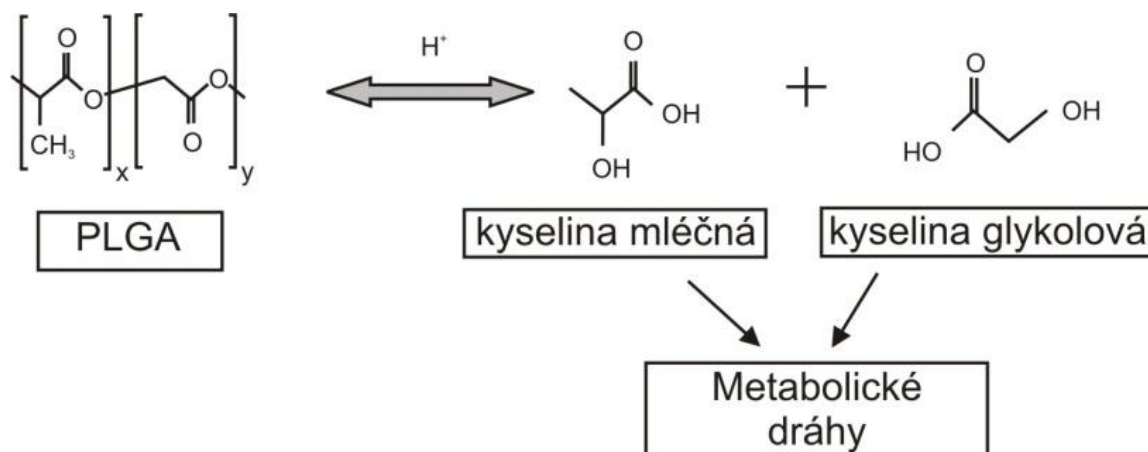
PLGA patří mezi biologicky odbouratelné polymery, které jsou schváleny Food and Drug Administration (FDA) [6]. Většina mechanických a termických vlastností PLGA je závislá na poměru PGA a PLA v kopolymeru.

#### Nejčastější aplikace PLGA

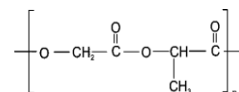
Kontrolované uvolňování léčiv, chirurgické nitě [7].

#### Degradační proces PLGA

Při kombinaci 70/30 PGA / PLA má tento kopolymer nejvyšší absorpci vody, je tedy nejrychleji degradovatelný. Při kombinaci 50/50 PGA/PLA je kopolymer nejméně odolný hydrolyze [6].



**Obrázek 5\_Hydrolyza PLGA nanočástic:** PLGA nanočástice biologicky hydrolyzují v kyselém prostředí na kyselinu glykolovou a kyselinu mléčnou. Tyto hydrolyzační produkty mohou být metabolizovány v citrátovém cyklu [21].



### Polykaprolakton (PCL)

PCL patří mezi biodegradovatelné polymery minerálního původu, které jsou získané z ropných produktů. PCL je termoplastický, hydrofobní polymer, vyrobený polymerací  $\epsilon$  – kaprolaktonu za přítomnosti katalyzátorů [14]. PCL je poměrně tažný s nízkou tuhostí [10]. Teplota skelného přechodu je - 60°C, teplota tání mezi 58 – 63°C a krystalizační stupeň 61% [7, 19].

PCL může být biologicky rozložitelný živými organismy ve venkovním prostředí, ale není biologicky rozložitelný v lidském těle z důvodu nedostatku vhodných enzymů. To však neznamená, že není biologicky vstřebatelný, ale že tento proces trvá mnohem déle díky hydrolytickému rozkladu [12]. Hodnota modulu tahu pro PCL je 0,4 GPa [6, 7].

#### Nejčastější aplikace

Potah chirurgických nití, dentální a ortopedické implantáty [7].

#### Degradační proces PCL

Dle morfologické struktury scaffoldu degraduje PCL kolem 12 měsíců [7]. Povrchová eroze je způsobena hydrolytickým štěpením na povrchu polymerního řetězce. Tato situace nastává, když štěpení hydrolytických řetězců, tvorba oligomerů a monomerů probíhá rychleji, než proniká voda do polymeru [7].

## 2.4 Modifikace scaffoldů pro urychlení biodegradace

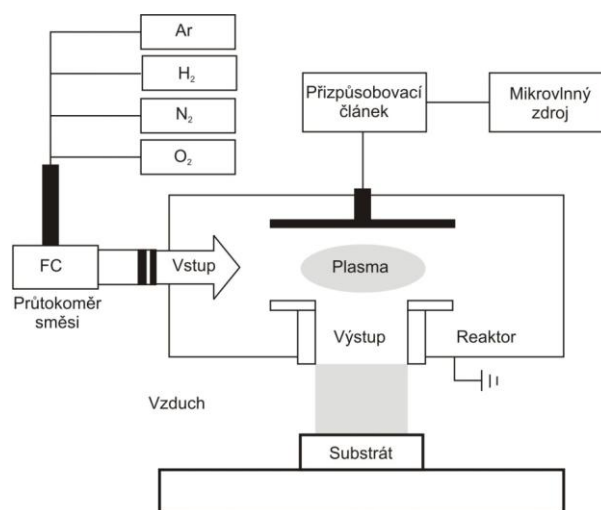
Základní vlastností scaffoldů je degradace bez negativních vedlejších účinků. Některé polymery však mají tendenci degradovat v prostředí lidského organismu příliš dlouhou dobu, proto je častým předmětem vědeckých prací vývoj vhodné modifikace polymeru.

### 2.4.1 Ošetření netermálním plazmatem

Úpravy polymerních vrstev plazmatem způsobují fyzikální a chemické změny, které zahrnují: síťování povrchu polymeru, částečnou degradaci polymeru, leptání povrchu a vznik volných radikálů [11]. S časem mírně roste koncentrace skupin, ve kterých kyslík a uhlík sdílí dvojnou vazbu, zatímco hlavní vlákenná struktura přetrvává. Plazmatické úpravy reagují na polymerních substrátech excitačními, deionizačními a disociačními jevy skrze fyzikální bombardování volných radikálů, které vkládají,

vytvářejí nebo odstraňují funkční skupiny na povrchu vrstvy [23]. Nejčastěji využívanými plyny jsou Ar, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a O<sub>2</sub> a různé kombinace inertních a reaktivních plynů.

Při úpravě plazmatem dochází k leptání vláken, což způsobuje jistá omezení. Tímto vlivem se snižují průměry vláken, zvyšuje se porozita a modifikuje povrchová struktura vlákna. Vysoká intenzita plazmatu by mohla vést k výrazné destrukci vlákenné vrstvy. Procesní podmínky plazmatu je možné upravit dle požadované intenzity narušení nanovláknenné vrstvy [23].



Obrázek 6\_Schéma zařízení pro netermální plazmatickou úpravu mikrovlnným výbojem [11].

Většina plazmatických úprav zahrnuje vakuový systém, což znemožňuje kontinuální proces [11]. Naopak výhodou vakuového systému je zajištění reakce nanovláknenné vrstvy pouze s vybranými plyny bez vlivu okolní atmosféry. Je však možné využít i atmosférickou netermální plazmatickou úpravu (neboli atmospheric cold plasma, dále jen ANP) reaktivními plyny, která nevyžaduje vakuový systém. ANP úprava má mnoho výhod, zejména nízkou spotřebu energie a jednoduchou konstrukci zařízení. Kromě toho má ANP úprava celou řadu využití včetně povrchové sterilizace nebo dekontaminace v oblastech biomedicíny a tkáňového inženýrství [11].

Při používání biologicky rozložitelných polymerních vrstev jako biomateriálů dochází zejména u PCL k omezení kvůli výrazné hydrofobnosti způsobené nízkou povrchovou energií. Nízká hydrofilnost polymerních scaffoldů snižuje schopnosti buněčné adheze, proliferace a diferenciaci. Plazmatickou úpravou je možné dosáhnout zvýšení hydrofility, biokompatibility a sterility implantátů [9, 11, 23].

### 2.4.2 Změna pH prostředí

Urychlení degradace je možné dosáhnout také změnou pH, což zvyšuje hydrolýzu polyesterů. Dle studie *Christophora X. F. Lam et al. (2008)* [22] byl scaffold pro urychlení degradace PCL na několik týdnů ponořen do 5M NaOH. Narušení polymerních vazeb bylo způsobeno působením velmi zásaditého pH při teplotě 37°C.

### 2.4.3 Kombinace syntetických a přírodních polymerů

Kompozity neboli blendy syntetických a přírodních polymerů nebo dvou syntetických polymerů, z nichž každý má jiné vlastnosti, jako například PCL/chitosan [3], PLA/PCL (50:50) [3], PLA/PCL [10], také umožňují zrychlení degradačního procesu.

Většina přírodních polymerů, jako kolagen nebo chitosan, prochází mimo jiné enzymatickou degradací. Seznam enzymaticky odbouratelných polymerů lze nalézt v práci *Park et al. (1993)* [29]. Rychlost degradace se výrazně liší umístěním implantátu a koncentrací enzymů v okolí implantátu. Například PCL, který je zástupcem syntetických polymerů, může doplnit schopnosti kompozitu o svou výraznou pružnost a schopnost minimalizovat lokální kyselost.

## 2.5 Metody analýzy degradace nanovlákných scaffoldů

Průběh degradace scaffoldů je možné analyzovat různými způsoby, např.: dle intervalů inkubace, velikosti vzorků, způsobu inkubace *in vivo* versus *in vitro*. Analýzy se kombinují dle potřebných výsledků vypovídajících určité charakteristiky degradačního procesu.

### Metody analýzy degradace scaffoldů:

- Hmotnostní změny scaffoldu [8],
- pH inkubačního roztoku [8],
- morfologické změny (SEM) [24, 22, 3, 4, 9],
- mechanické vlastnosti scaffoldu [24, 22, 3, 13],
- molekulová hmotnost (kapalná chromatografie) [24, 8, 13],
- viskozita inkubačního roztoku [2],
- hydrofilita [26],
- porozita nanovlákné vrstvy [3, 24, 13],
- matematické modelování [27],
- krystalinita polymeru (DSC) [25],
- změny chemických funkčních skupin (FTIR) [8, 11, ],
- vazebná místa funkčních skupin (XPS) [26, 11 ],
- určení kvantity látek (XRD) [8].

### 2.5.1 Hmotnostní změny scaffoldu

Hmotnostní změny scaffoldu jsou procentuálně vyjádřeny (viz rovnice 1) jako rozdíl počáteční a konečné hmotnosti, který je vydělen počáteční hmotností. Na počátku vývoje scaffoldu se tyto hodnoty získávají pouze *in vitro*, před vložením vzorku do inkubačního roztoku a po jeho vysušení. Následně se vzorky testují *in vivo*, tedy před voperováním a po vyjmutí implantátu z pokusného organismu [24].

Úbytek hmotnosti scaffoldu orientačně vypovídá o množství uvolněných polymerních fragmentů do okolního roztoku a umožňuje přibližné stanovení stupně degradace. V případě zvýšení hmotnosti, oproti počátečnímu stavu, můžeme uvažovat např. usazení krystalů solí [8].

### 2.5.2 Změny pH inkubačního roztoku

Dle snížení nebo navýšení hodnoty pH je možné orientačně sledovat chemické změny v inkubačním roztoku a tím usuzovat o průběhu degradace scaffoldu. Hodnota pH se mění dle koncových skupin, které již prošly erozí a jsou uvolněny do inkubačního roztoku. Pokud dochází ke zvyšování pH, může například docházet k uvolňování hydroxylových skupin (-OH), v případě snížení pH se mohou uvolňovat karboxylové skupiny (-COOH).

### 2.5.3 Morfologické změny struktury (SEM)

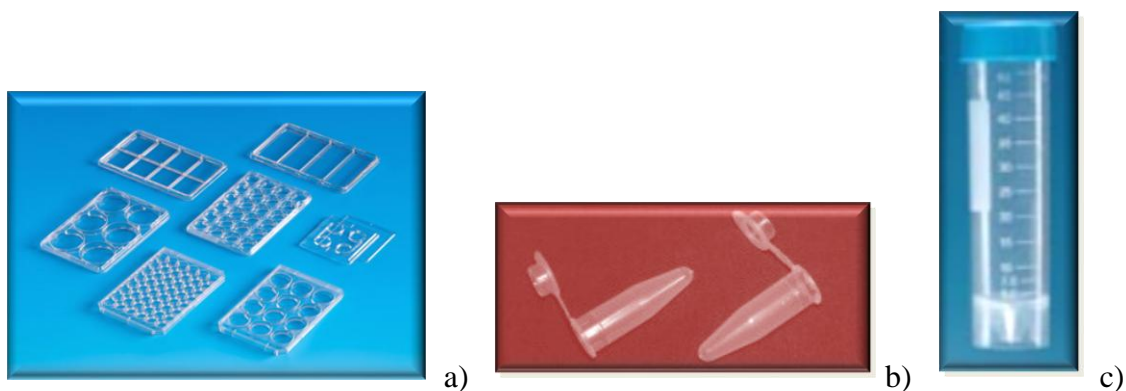
Skenovací elektronový mikroskop (SEM) umožňuje pozorování povrchů různých materiálů s velkou hloubkou ostrosti a nastavitelným rozlišením. Pro zvýšení kvality snímků SEM se využívá metody naprašování vodivých materiálů. Tímto postupem je dosaženo vyššího rozlišení obrazu. Vizuálním hodnocením snímků SEM je možné porovnávat např.: strukturální rozložení vláken, jejich průměry, defekty, porozitu a povrch vláken.

Mikroskopickou analýzu je možné doplnit dalším zpracováním výstupních snímků např. softwarem NIS – Elements. Pomocí programu specializovaného na měření průměrů vláken je možné kalibrovat snímky při různém zvětšení a vyhodnotit průměry vláken s rozdělením četností a směrodatnou odchylkou. Konečným výstupem je tabulkový přehled naměřených dat a histogram četností vláken.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Účelem experimentální části bakalářské práce je návrh a optimalizace procesních podmínek testování degradačních vlastností scaffoldů v nových biologických laboratořích Katedry netkaných textilií TU Liberec.

Jako materiál pro elektrostatické zvlákňování scaffoldu byl vybrán PCL, tedy alifatický polymer s dlouhou dobou degradace. Některé vzorky PCL nanovláknenného scaffoldu byly vystaveny netermální vakuové plazmatické úpravě (NVP). Při NVP byly použity tyto plyny: Ar, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, a to v čisté formě bez vzájemného míšení. Po vysušení vzorků v předem stanovených intervalech o celkovém rozmezí 14 – ti týdnů následovala analýza změn vlivem degradace.



Obrázek 7\_Kultivační destičky (a), mikrozkušavky Eppendorf (b), polypropylenová centrifugační zkumavka (c).



### 3.1 Použitý materiál a přístroje

Při práci v laboratořích byly použity níže uvedené přístroje a chemikálie. Je také uvedeno rozlišení měřicích přístrojů.

#### 1) Použité chemikálie

Tabulka 3\_Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce
Fosfátový pufr (PBS)	Lonza
Azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )	SIGMA - ALDRICH

#### 2) Studovaný polymer

Byl použit PCL o molární hmotnosti  $M = 45\,000\text{ g/mol}$  (Sigma – Aldrich).

#### 3) Přístrojové vybavení

Tabulka 4\_Přehled použitých přístrojů

Přístroj	Typ přístroje
pH metr	Eutech pH 700 (rozlišení $\pm 0,01$ )
Analytické váhy	ACCULAB Atilon (rozlišení $\pm 0,1\text{ mg}$ )
Magnetické míchadlo	RH basic 2 IKAMAG
Biologický laminární box	Telstar BIO II A
Parní autokláv	PS 20A/1
Biologický termostat	BT 120
Skenovací elektronový mikroskop (SEM)	PHENOM G2 (zvětšení 20x – 20 000x)
Obrazová analýza	Software NIS - Elements

### 3.2 Výroba PCL nanovlákených scaffoldů

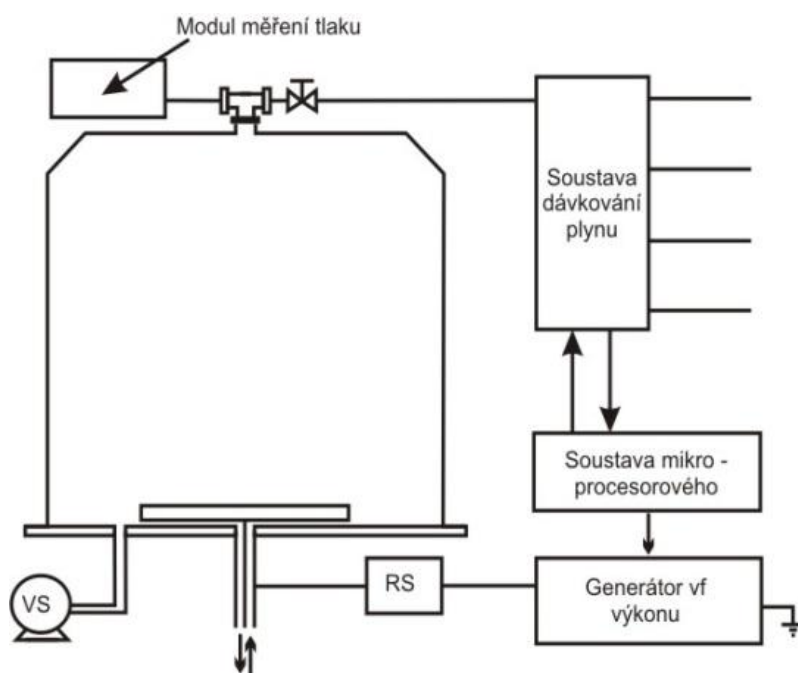
Pro výrobu PCL nanovlákených scaffoldů byla zvolena technika elektrospinningu z válečku. Této zvláknovací metody bylo využito za účelem vyšší produkce vláken oproti ostatním technikám. PCL nanovlákené vrstvy byly v prostředí NVP vystaveny působení vybraných plynů.

### 3.2.1 Elektrosinning

PCL byl zvlákňován z 15 % roztoku. Jako rozpouštědlo byla použita směs chloroform – ethanol. Pro výrobu nanovlákněné vrstvy byl zvolen elektrosinning z válečku. Podkladovou vrstvou při zvlákňování po dobu 10 min byl Spunbond. Na kolektor bylo přivedeno napětí  $U_k = 10 \text{ kV}$  a na váleček  $U_V = 30 \text{ kV}$ .

### 3.2.2 PCL nanovlákněné scaffoldy modifikované NVP

Zvlákněný PCL byl ošetřen NVP s použitím Ar, N<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> plynů. Pro každý plyn byla použita vždy jedna oddělená část vlákněné vrstvy o rozměrech 15 x 15 cm. Tyto vzorky byly oddělené z celku, který byl připraven v rámci jednoho zvláknovacího procesu. Plazmatická úprava povrchu PCL nanovlákněné vrstvy byla provedena při procesních podmínkách uvedených v tabulce 5.



Obrázek 8\_Schéma nízkotlaké RF - PECVD aparatury: RS – regulační soustava, VS – vakuová soustava.

Porovnání účinku NVP bylo také stanoveno dle stupně hydrofility (viz tabulka 9 kap. Výsledky). Hydrofilita byla měřena kapkovou metodou. Objem kapky byl vždy 2 ml a čas vstřebání kapky do textilie uveden v sekundách.

Jedním z prvků ovlivňujících biodegradaci je plošná hmotnost nanovlákněné vrstvy. Bylo ověřeno jaký vliv má modifikace NVP na plošnou hmotnost textilie, což je

uveďeno v tabulce 8 kap. Výsledky. Pro získání průměrných hodnot plošné hmotnosti bylo měřeno 10 stejně velkých vzorků.

**Tabulka 5\_Procesní podmínky netermální vakuové plazmatické úpravy.**

Parametr NVP	Hodnota parametru
Napětí $U$	250 V
Čas $t$	5 min
Tlak $p$	30 Pa
Průtok plynů $q$	25 cm <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup>

### 3.3 Příprava scaffoldů před inkubací

Příprava vzorků probíhala dle předem sestaveného protokolu. Při vypracování protokolu se vycházelo z odborné literatury [8, 9, 10].

#### 3.3.1 Testování kultivačních nádob

Před inkubací vzorků byla testována rychlost odpařování roztoku PBS z jednotlivých inkubačních nádob (obr. 7) při teplotě 37°C. Porovnání procentuálního objemového úbytku znázorňuje grafu 1 v kap. Výsledky.

#### 3.3.2 Průběh přípravy vzorků

Testované vrstvy A, B, C, D, E (viz tab. 6) byly odděleny od vrstvy Spunbondu a nastříhány na díly o přibližně stejných rozměrech (0,5 cm<sup>2</sup>). Z každé vrstvy bylo odděleno 33 dílů, přičemž 16 dílů z každé vrstvy bylo sterilizováno, vloženo do inkubačního roztoku a umístěno do biologického termostatu při 37°C. Další 16 dílů bylo jen sterilizováno a poté uchováno v termostatu. Jeden vzorek byl ponechán beze změn pro analýzu SEM kvůli porovnání původní vlákně struktury.

**Tabulka 6\_Přehled inkubovaných scaffoldů.**

Označení	Popis scaffoldu
A	PCL vrstva, která byla ponechána se svou podkladovou vrstvou Spunbondu.
B	PCL vrstva s ošetřením ANP – Ar.
C	PCL vrstva s ošetřením ANP – N <sub>2</sub> .
D	PCL vrstva s ošetřením ANP – CH <sub>4</sub> .
E	PCL vrstva bez Spunbondového podkladu.

Všechny vzorky byly zváženy na analytických vahách. Jejich počáteční hodnoty ( $w_0$ ) byly zaznamenány stejně jako hodnoty navážené v daných časových intervalech po inkubaci ( $w_t$ ).

Sterilizace vzorků probíhala v biologickém laminárním boxu vždy u 16 - ti vzorků z každého druhu vrstvy. Nejdříve byly vzorky sterilizovány v 96 % etanolu o objemu 2 ml po dobu 15 minut. Poté byly vzorky oplachovány 2 x 15 minut v roztoku PBS. Konečným bodem sterilizace bylo vystavení vzorků 30 – ti minutovému působení UV záření.

Kultivační roztok PBS + 0,05%  $\text{NaN}_3$  byl přidán do 16 – ti sterilních mikrozkmavek Eppendorf v objemu 2,5 ml. Byla naměřena počáteční hodnota pH samotného kultivačního roztoku pro porovnání se změnami pH po inkubaci.

Do biologického termostatu byla uložena jedna sada vzorků v inkubačním roztoku, uzavřených ve sterilních mikrozkmavkách a druhá sada kontrolních vzorků vložených pouze do kultivačních destiček bez roztoku.

### 3.4 Analýza degradace PCL nanovláknenných scaffoldů

Pro hodnocení biodegradace PCL nanovláknenných scaffoldů byly zvoleny základní metody analýzy, které byly aplikovány ve stejných inkubačních intervalech (viz tab. 7).

Během těchto intervalů, umožňujících pravidelnou kontrolu procesu, byly prováděny analýzy vzorků A, B, C, D, E.

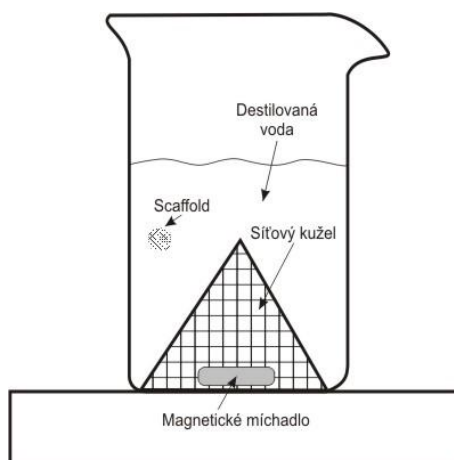
**Tabulka 7\_Přehled inkubačních intervalů.**

Datum	20.1. 2012	23.1. 2012	30.1. 2012	6.2. 2012	13.2. 2012	20.2. 2012	27.2. 2012	5.3. 2012	12.3. 2012	19.3. 2012	2.4. 2012	16.4. 2012	30.4. 2012
Inkubace	0	3 dny	1 týden	2 týdny	3 týdny	4 týdny	5 týdnů	6 týdnů	7 týdnů	8 týdnů	10 týdnů	12 týdnů	14 týdnů

#### 3.4.1 Vymývání a sušení vzorků

Na konci inkubačního intervalu byly scaffoldy promývány v kádince s destilovanou vodou umístěné na magnetické míchačce (viz obr. 9). Rotující magnetické míchadlo na dně kádinky bylo obklopeno síťovým kuželem, aby se zamezilo mechanickému poškození vzorku. Po důkladném odstranění ulpívajících solí

na povrchu vláken, byly scaffoldy sušeny min. 24 hodin na destičce s teflonovým povrchem umístěné v biologickém termostatu při teplotě 37°C.



Obrázek 9\_Schématické znázornění úpravy kádinky.

#### 3.4.2 Změny pH inkubačního roztoku

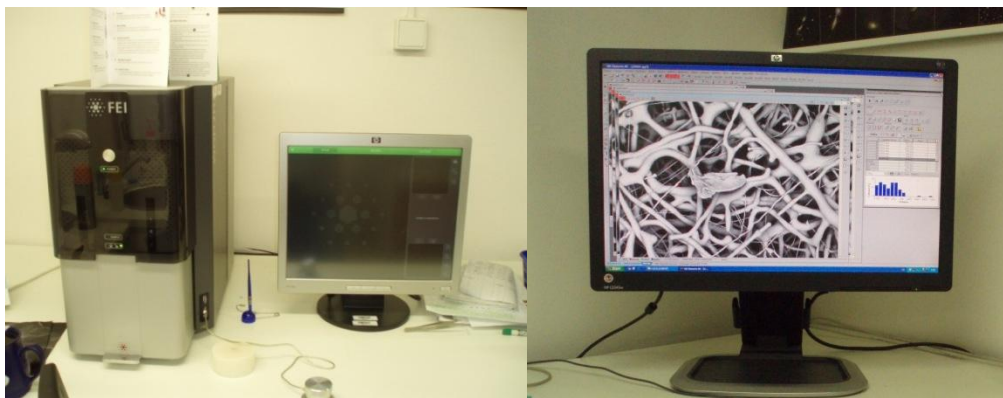
Po vyjmutí vzorku z mikrozkušavky Eppendorf bylo změřeno pH inkubačního roztoku, jehož změny byly zaznamenávány v časovém horizontu 14 – ti týdnů.

#### 3.4.3 Hmotnostní změny PCL nanovláknenného scaffoldu

Hmotnostní změny byly sledovány ve stejných intervalech u scaffoldů po inkubaci v roztoku a zároveň u scaffoldů po suché inkubaci. Konečné hmotnosti vzorků a hmotnostní rozdíly byly zaznamenány jako  $w_t$ .

#### 3.4.4 Analýza morfologických změn PCL nanovláknenného scaffoldu

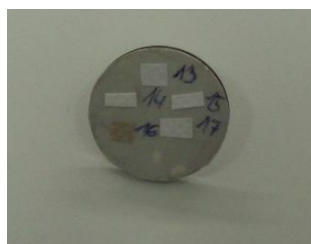
Morfologické změny nanovláknenné struktury scaffoldů A, B, C, D, E, byly pozorovány na základě snímků SEM při zachování stejných inkubačních intervalů pro všechny typy vzorků. Dále byly tyto snímky použity pro analýzu softwarem NIS – Elements.



Obrázek 10\_SEM PHENOM a Software NIS-Elements používaný v laboratořích katedry Netkaných textilií TUL.

### A) Příprava vzorků pro SEM

Vysušené nanovláknenné scaffoldy byly stříhány na malé vzorky o přibližné velikosti 4 x 4 mm. Poté byly nalepeny na targety (obr. 11 a) a očíslovány. Pro zvýšení ostrosti snímků SEM byl každý target s přilepenými vzorky pozlacen (obr. 11 b).



a)



b)

Obrázek 11\_Scaffoldy přilepené na targety bez pozlacení (a), pozlacené vzorky (b).

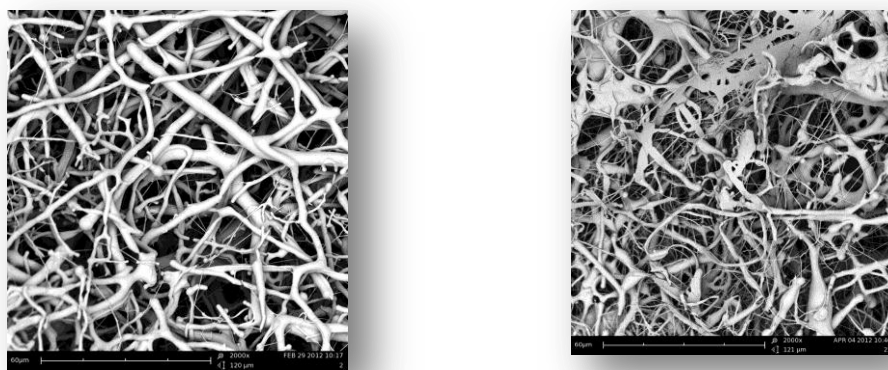
### B) Měření průměrů vláken softwarem NIS – Elements.

Snímky ze SEM byly podkladem pro měření průměrů vláken v Softwaru NIS – Elements. Tento software umožňuje kalibrovat snímky s rozdílným zvětšením a převedení průměrných hodnot do zvolených délkových jednotek. K získání středních hodnot bylo měřeno vždy 100 vláken.

## 4. VÝSLEDKY

Mechanismus biodegradace PCL nanovláknenných scaffoldů byl vyhodnocen do několika grafů a tabulek shrnujících změny v průběhu degradačního procesu. Byly sledovány změny počáteční a konečné hmotnosti, změny pH inkubačního roztoku a morfologické změny scaffoldu. Dále byly orientačně stanoveny hodnoty plošné hmotnosti a hydrofilita PCL nanovláknenných vrstev.

Bakalářská práce byla zaměřena prioritně na vypracování metodiky laboratorního postupu, proto nebyla zvolena podrobnější analýza vypovídající o změnách chemické struktury PCL.



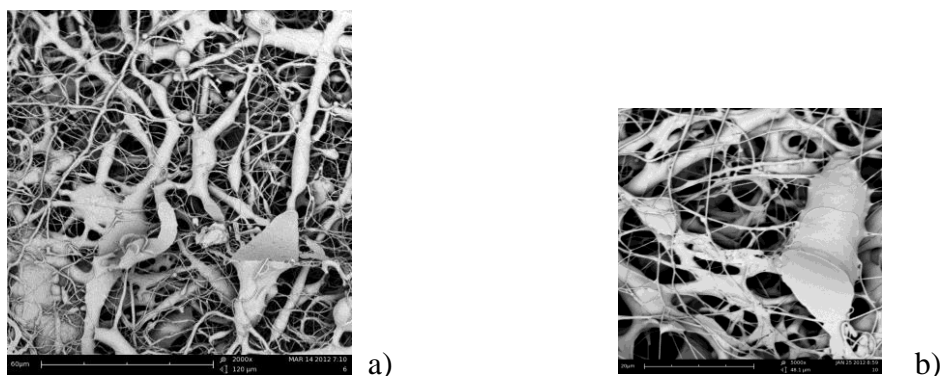
Obrázek 12 Snímky SEM vláken ošetřených NVP - Ar. Vlevo vlákna po 6 - ti týdnech inkubace. Vpravo vlákna po 12 - ti týdnech inkubace. Snímky jsou zvětšeny 2000x.

## 4.1 Vliv výrobní technologie na PCL nanovláknenné scaffoldy

Vláknenná struktura scaffoldu byla charakteristická svou nestejnou hustotou způsobenou technologií výroby. Vlivem NVP byla struktura vrstvy i povrchu vláken narušen intenzivněji.

### 4.1.1 Elektrospinning

PCL nanovláknenná vrstva obsahovala vlákna s velkým rozptylem středních hodnot průměrů vláken. Rovnoměrnost struktury byla narušena velkým množstvím defektů ještě před NVP (viz obr. 13 a, b). Proto není možné jednoznačně určit průběh degradačního procesu v celém obsahu vzorku pouze analýzou SEM.



Obrázek 13\_ Snímky SEM - defekty vláknenné struktury před inkubací a) PCL zvětšeno 2000x, b) PCL zvětšeno 5000x.

### 4.1.2 PCL nanovláknenné scaffoldy modifikované NVP

Povrchová část nanovláknenných vrstev ošetřených NVP byla v některých místech deformována do zploštělých tvarů (viz příloha I). Po seřazení snímků dle jednotlivých modifikací se ukázala jistá podobnost struktury jednotlivých typů scaffoldů.

Průběžným sledováním bylo zjištěno, že jednostranně upravené nanovláknenné vrstvy mění průměr vláken rychleji na straně, která byla ošetřena plyny NVP.



Tabulka 8\_Porovnání průměrné plošné hmotnosti po ošetření netermálním plazmatem a bez ošetření.

Plošná hmotnost materiálů [g/m <sup>2</sup> ]	
PCL	48,6
PCL + Ar	80,4
PCL + N <sub>2</sub>	74,5
PCL + CH <sub>4</sub>	42,8

Byly porovnány změny plošné hmotnosti (tab. 8) dle jednotlivých modifikací. Plošná hmotnost PCL + Ar je výrazně navýšena, což může být způsobeno narušením struktury polymerního řetězce těžkými atomy Ar. Argonový plyn při NVP způsobuje narušení vazeb polymerního řetězce, které na sebe po vyjmutí vlákenné vrstvy z vakua navazují jiné prvky z atmosféry.

Testováním hydrofility kapkovou metodou byla jako nejvíce hydrofilní vyhodnocena vlákenná vrstva po úpravě NVP + Ar (tab. 9). Vysoká hydrofilita způsobuje zachycení vzdušné vlhkosti na povrchu vláken. Podobný efekt může vznikat i u vrstev ošetřených NVP + N<sub>2</sub>.

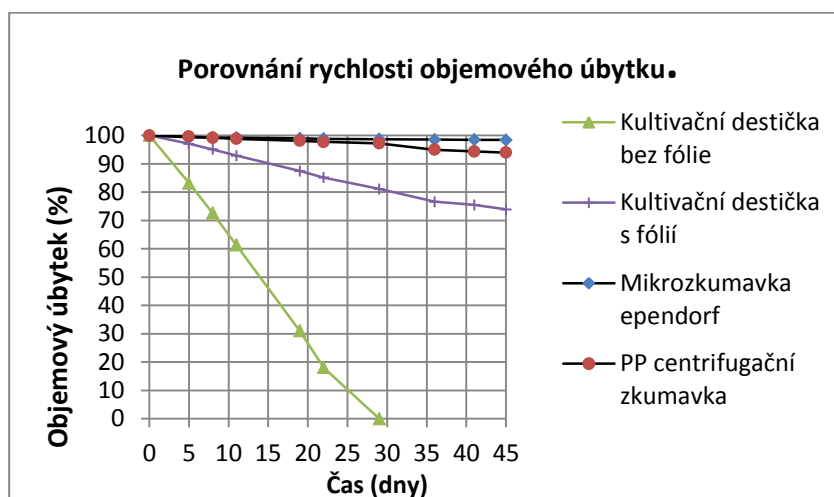
Tabulka 9\_Porovnání hydrofility u jednotlivých typů scaffoldů.

Vzorek	PCL	PCL + Ar	PCL + N <sub>2</sub>	PCL + CH <sub>4</sub>
Čas [s]	163	5	11	43

## 4.2 Příprava inkubačního procesu

Před začátkem biodegradace proběhlo ověření několika kultivačních nádob uchovávajících scaffoldy při testování dlouhodobé degradace. Byl zjištěn procentuální úbytek inkubačního roztoku v závislosti na čase (viz graf 1).

Kultivační destička bez krycí fólie je dle grafu vhodná jen pro krátkodobou kultivaci do jednoho měsíce. Mikrozkuhavka Eppendorf zadržuje inkubační roztok nejlépe, ale umožňuje kultivaci scaffoldů pouze o malých rozměrech. Nejvhodněji pro dlouhodobou degradaci vychází polypropylenová (PP) centrifugační zkuhavka (50 ml), jejíž velikost umožňuje inkubaci scaffoldů dostatečných velikostí a odpařování roztoku je pomalé.



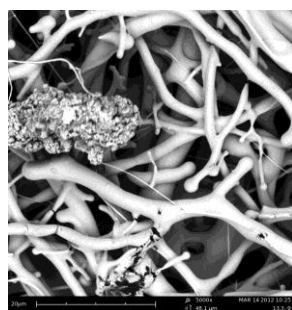
Graf 1\_Porovnání rychlosti objemového úbytku ve vybraných nádobách.

### 4.3 Analýza degradace PCL nanovlákných scaffoldů

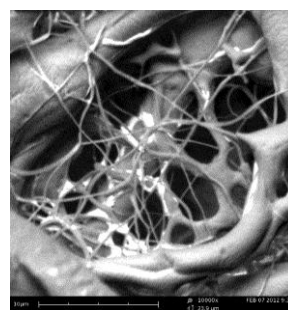
K analýze biodegradace byly použity metody zaměřené na povrchové změny struktury PCL nanovlákných scaffoldů. Degradace nanovlákných scaffoldů byla hodnocena měřením úbytku hmotnosti, změnou pH roztoku a změnou morfologie vláken.

#### 4.3.1 Vymývání a sušení vzorků

Soli obsažené v kultivačním roztoku PBS způsobují mezi vlákny PCL scaffoldu častý výskyt krystalů (viz obr. 14 a) nebo zkreslují strukturu vláken usazením na jejich povrchu (viz obr. 14 b). Dalším důvodem pro důkladné odstranění těchto solí je vliv na výsledky při vážení hmotnostních změn scaffoldu.



a)

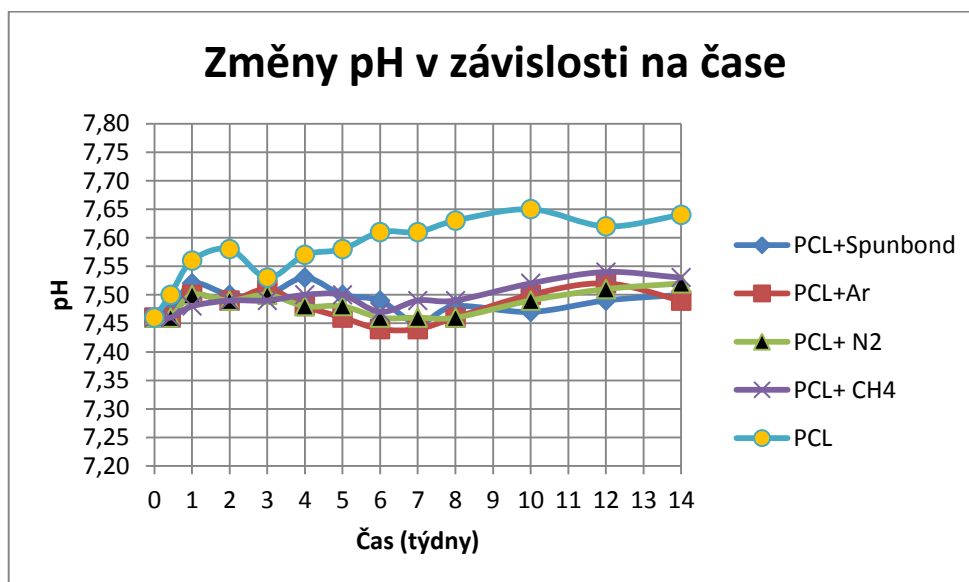


b)

Obrázek 14\_Zkrystalizované soli. Snímky SEM a) PCL zvětšeno 5000x, b) PCL zvětšeno 10 000x.

#### 4.3.2 Změny pH inkubačního roztoku

Změny pH znázorněné v grafu 2 ukazují podobný charakter hodnot u všech vzorků s výjimkou inkubace PCL scaffoldu bez Spunbondu. Ani v jednom případě však není možné stanovit lineární závislost. Změny hodnot pH mohou být způsobeny uvolněními koncovými skupinami polymerního řetězce, které vznikají v důsledku hydrolýzy. Jistý vliv může mít i odpařování roztoku.



Graf 2\_Změny pH v závislosti na čase. Hodnoty jsou uvedeny  $\pm 0.01$  pH

#### 4.3.3 Hmotnostní změny PCL nanovláknenného scaffoldu

Hmotnostní změny PCL scaffoldů mají značně proměnný charakter (viz příloha III). K nejčastějšímu nárůstu hodnot docházelo u PCL scaffoldu po ošetření NVP + CH<sub>4</sub> při inkubaci v roztoku.

Nárůst hmotnosti byl odůvodněn nedostatečným vysycháním vzorků nebo nedokonalým odstraněním solí obsažených v kultivačním roztoku PBS.

#### 4.3.4 Analýza morfologických změn PCL nanovláknenných scaffoldů

Zvolená technologie výroby způsobuje široký rozptyl průměrů vláken, což značně zhoršuje analýzu biodegradace hodnocením průměrů vláken, přesto je ale patrné snížení průměru vláken po plazmatické úpravě. PCL degraduje v řádu měsíců, proto je vhodné ponechat si pro sledování degradačních vlastností delší časový úsek. Pro experimentální část této bakalářské práce byly zvoleny intervaly dle tabulky 7.

### **A) Analýza snímků SEM**

Snímky z elektronového mikroskopu (viz příloha I) ukazují vliv různých modifikací na vlákennou strukturu. PCL nanovláknenné scaffoldy bez ošetření NVP obsahují hladká vlákna s rozdílnými průměry. Vlákna modifikovaná NVP jsou deformována do specifických tvarů charakteristických pro použitý plyn NVP.

### **B) Analýza softwarem NIS - Elements**

Z histogramů (viz příloha II), které nejsou tolik zatíženy směrodatnou odchylkou průměrů, je však možné vidět navyšující se počet tenkých vláken v závislosti na čase.

U PCL nanovláknenných vrstev modifikovaných NVP + Ar je zřejmý snižující se charakter vláknenných průměrů přibližně od 7. týdne degradace. NVP + N<sub>2</sub> úprava způsobila v porovnání s vlákny bez ošetření snížení průměru vláken již od začátku. U NVP + CH<sub>4</sub> byl sledován poměrně stabilní charakter histogramu již po tří denní inkubaci.

Zajímavým výsledkem, který vyplývá z histogramů, je závislost mezi vzorkem po inkubaci v roztoku a suchým kontrolním vzorkem ponechaným při stejné teplotě. Tyto vzorky mají ve stejném inkubačním intervalu podobný charakter histogramu i hodnoty průměrů. Dle tohoto výsledku je možné usoudit, že v časovém horizontu 0 - 14 týdnů má inkubace PCL scaffoldů v suchém i v mokré prostředí podobný účinek na degradaci vláken.

## 5. ZÁVĚR

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vytvoření podkladu pro navazující studie zabývající se podobnou tematikou. V průběhu dvou semestrů věnovaných tématu bylo řešeno několik otázek týkajících se návrhů na zlepšení průběhu laboratorního testování biodegradability PCL nanovlákných scaffoldů. V této závěrečné kapitole jsou popsány některé závislosti vyplývající z výsledků doplněné o návrhy na změny v postupu.

Scaffoldy byly vyrobeny technikou elektrosponingu z modifikovaného válečku. Touto technikou zvláknování bylo vytvořena vrstva s velkými defekty. Kvůli velkému rozptylu nebylo možné porovnávat střední hodnoty průměrů vláken v závislosti na stupni degradace. Pro následné studie biodegradačních vlastností bude nutné doplnit obrazovou analýzu i dalšími metodami vhodnými pro sledování procesu chemických změn provázejících biodegradaci PCL.

Doba k začátku biodegradace PCL bývá uváděna v horizontu několika měsíců. Tento časový úsek je ovlivněn řadou faktorů, jako je např.: velikost specifického povrchu či okolní prostředí polymeru. Pro experimentální část bakalářské práce byla zvolena PCL nanovlákná vrstva v kombinaci s modifikací netermálním vakuovým plazmatem (NVP), a to právě kvůli testování vlivu změn povrchu.

Proběhlo porovnání základních rozdílů PCL nanovlákných scaffoldů po modifikaci NVP. Prezentované výsledky ukazují výrazný vliv úpravy NVP na povrch nanovlákné struktury. PCL vlákna bez tohoto ošetření jsou hladká, mají vyšší hodnoty průměrů vláken a pravidelnější uspořádání. Na PCL vláknech s modifikací NVP jsou patrné charakteristické změny zvyšující specifický povrch scaffoldu. Velký specifický povrch způsobuje rychlejší difúzi kapalin, přičemž urychlení difúze má velký vliv na hydrolytický rozklad scaffoldu. Na PCL nanovlákných scaffoldech s modifikací NVP jsou v biologické laboratoři TUL testovány buněčné kultury. Tyto testy by měly ověřit, jak ovlivňuje deformace vláken proliferaci buněk.

V průběhu biodegradace byly sledovány hmotnostní změny scaffoldů. Docházelo k nepravidelnému kolísání hodnot v řádu desetin mg. (viz příloha III). Pouze u scaffoldu upraveného NVP v prostředí  $\text{CH}_4$  docházelo ke stabilnímu zvyšování hodnot s výjimkou 14. týdne. Výsledky mohly být zkresleny výskytem solí obsažených v mezivlákných pórech. Vzniklé krystaly by měly být vymývány minimálně 30 minut v deionizované vodě. Pozornost by měla být věnována i vhodnému časovému intervalu

vysoušení vzorků. Výsledky mohou být zpřesněny větší velikostí vzorků a zvýšením počtu měření.

Změny nastávající v inkubačním roztoku byly sledovány měřením pH. Dle výsledného grafu změn pH v závislosti na čase (viz graf 2) mají hodnoty většiny vzorků podobný charakter a hodnota pH se výrazně nemění. Výjimkou je PCL nanovláknenný scaffold bez nosné textilie. Důvod této odchylky se zatím nepodařilo objasnit. Měření pH inkubačního roztoku by bylo vhodné doplnit např. měřením změn viskozity v čase nebo chemickým rozbořem uvolněných koncových skupin ze scaffoldu.

Biodegradace scaffoldů v biologické laboratoři TU Liberec bude i nadále sledována. V přípravné fázi bude sestaven podrobný teoretický rozbor procesu biodegradace zvoleného polymeru a příprava vhodného souboru metod k testování biodegradace. Nedílnou součástí přípravy bude stanovení požadovaných informací, které by měly být v závěru získány. Požadavkům na výstupní hodnoty by měly být přizpůsobeny techniky výroby scaffoldu, metody analýzy, velikost vzorků a s tím spojený objem inkubačního roztoku, celková časová náročnost, vhodné intervaly testování a doba biodegradace, dostupnost přístrojů a mnoho jiných prvků ovlivňujících výsledky a jejich vypovídací hodnoty.

## SEZNAM LITERATURY

- [1] Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.: *Principles of tissue engineering*. 2007, 17-20s., ISBN 13: 978-0-12-370615-7
- [2] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., et al.: *Základy buněčné biologie*. *Espero Publishing*, 1998, 153s. ISBN 80 – 902906 – 2 – 0.
- [3] Wan, Y., Wu, H.: Compressive mechanical properties and biodegradability of porous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds. *Polymer Degradation and Stability*, 2008, 93: 1736–1741s.
- [4] Edwards, L., S., Mitchell, W., et al.: Design of nonwoven scaffold structures for tissue. *AUTEX Research Journal*, 2004.
- [5] Vasita, R., Katti, S., R.: Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 2006, 1: 15–30s.
- [6] Gunatillake, P., A., Adhikari, R.: Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 2003, 1:1 – 6s. ISSN 1473 – 2262.
- [7] Armentano, I., Dottori, M.: Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 95: 2126 – 2146s.
- [8] Zhang, K., Yin, A., Huang, Ch., et al.: Degradation of electrospun SF/P(LLA-CL) blended nanofibrous scaffolds in vitro. *Polymer Degradation and Stability*, 2011, 1 – 10s.
- [9] Prabhakaran, M., P., Venugopal, J., et al.: Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology*, 2008, 1 – 9s.
- [10] Vieira, A., C., Ferr, J., M., et al.: Mechanical study of PLA–PCL fibers during in vitro degradation. *Science Direct*, 2011, 4: 451 – 460s.
- [11] Lee, H., U., Jeong, Y., S., et al.: Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly ε-caprolactone film. Republic of Korea: *Applied Surface Science*, 2008, 254: 5700 – 5705s.
- [12] Woodruff, M., A., Hutmacher, D., W.: The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35: 1217 – 1256 s.
- [13] Yang, F., Cui, W., Xiong, Z., et al.: Poly(L,L-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Science Direct*, 2006, 91: 3065 – 3073s.

- [14] Kroisová, D.: *Biodegradovatelné polymery – úvod do problematiky*. 2009, 30 s. ISBN 978-807372-468-9
- [15] NOLAN-ITU PTY LTD. *BiodegradablePlastics - Developments and EnvironmentalImpacts* [online]. 2002, [cit. 2012-03-03]. Dostupný z: <<http://www.environment.gov.au/>>.
- [16] Burkersroda, F., Schedl, L., et al.: Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*. 2002, 23: 4221 – 4231s.
- [17] Jirsak, O., Petrik, S. et al.: Needle electrospinning – history present and future. *7<sup>th</sup> International Conference – TEXSCI*, 2010.
- [18] Stolta, M., Hycail, B., V.: Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Science Direct*. 2001, 2: 6 – 12s.
- [19] Rosa, D., S., et al.: *Evaluation of thermal, mechanical and morphological properties of PCL/CA and PCL/CA/PE-g-GMA blends*. 2006.
- [20] Jirsak, O., Dao, A., T.: Roller electrospinning in various ambient parameters. *NANOCON*, 2010.
- [21] Kumari, A., Yadav, S., K. et al.: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75: 1 – 18s.
- [22] Lam, Ch., X., F., Savalani, M., M., et al.: Dynamics of *in vitro* polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions [online]. *IOPscience*, 2008, [cit. 2012-05-03]. Dostupný z: <<http://iopscience.iop.org/1748-605X/3/034108>>.
- [23] Zanden, C., Voinova, M., Gold, J., et al.: Surface characterisation of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fibres and their interaction with red blood cells. *European Polymer Journal*. 2012, 48: 472 – 482s.
- [24] Lam, X., F., Hutmacher, D., W., et al.: Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Wiley InterScience*. 2008
- [25] Pitt, C., G., Chasalow, F., I., et al.: Aliphaticpolyesters. I. Thedegradation of poly(epsiloncaprolactone) in vivo. *Appl Polym Sci*, 1981, 26:3779–3787s.
- [26] Ryu, H., G., Yang, W., S., et al.: Plasma surface modification of poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering. *Science Direct*, 2005, 193: 60 – 64s.
- [28] Gauvin, R., Bareil, R., P.: Hydrogels and microtechnologies for engineering the cellular microenvironment. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2012, 4: 235 – 246s.
- [29] Park, K., Shalaby, W., Park, H.: Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. *Technomic Publ.*, 1993.



## SEZNAM TERMÍNŮ A ZKRATEK

### **Biodegradace**

Biodegradovatelné jsou organické látky, které se rozkládají v důsledku degradace *in vivo* [12].

### **Proliferace**

Tvoření nové tkáně podmíněné množением buněk.

### **Scaffold**

Tkáňový nosič tvořící podpůrnou strukturu napomáhající růstu tkáně [3].

### **NVP**

Netermální vakuové plazma (NVP z angl. non thermal vakuum plasma).

### **ANP**

Atmosférické netermální plazma (ANP z angl. atmospheric non thermal plasma).

### **SEM**

Skenovací elektronový mikroskop (SEM z angl. Scanning electron microscope).

### **ECM**

Extracelulární matrix neboli mezibuněčná hmota, kterou kolem sebe vylučují buňky pojivových tkání [17].

### **PLA**

Kyselina polylaktidová (PLA z angl. Poly lactic acid).

### **PGA**

Kyselina polyglykolová (PGA z angl. Poly glycolic acid).

### **PLGA**

Kopolymer kyseliny polylaktid – glykolové (PLGA z angl. poly (d,l-lactic-co-glycolic acid)).

### **PCL**

Polycaprolakton (z angl. polycaprolacton).

### ***In vivo***

V živém organismu (*in vivo* z lat.).

### ***In vitro***

V umělých podmínkách (*in vitro* z lat.).

### **FDA**

Správa potravin a léčiv v USA (FDA z angl. Food and Drug Administration).

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Schéma znázorňující izolaci kmenových buněk, kultivaci buněk *in vitro* na vhodném scaffoldu a implantaci *in vivo*
- Obrázek 2: Schéma zvlákňování z válečku
- Obrázek 3: Schematické znázornění průběhu povrchové a objemové eroze polymerní matrix
- Obrázek 4: Ilustrativní mechanismus degradace polymerních esterů
- Obrázek 5: Hydrolýza PLGA nanočástic
- Obrázek 6: Schéma zařízení pro netermální plazmatickou úpravu mikrovlnným výbojem
- Obrázek 7: Kultivační destičky, mikrozkušavky Eppendorf, polypropylenová centrifugační zkumavka
- Obrázek 8: Schéma nízkotlaké RF - PECVD aparatury
- Obrázek 9: Schematické znázornění úpravy kádinky
- Obrázek 10: SEM PHENOM a Software NIS-Elements používaný v laboratořích katedry Netkaných textilií TUL
- Obrázek 11: Scaffoldy přilepené na targety bez pozlacení a pozlacené vzorky
- Obrázek 12: Snímky SEM vláken ošetřených NVP - Ar. Vlevo vlákna po 6 - ti týdnech inkubace
- Obrázek 13: Snímky SEM - defekty vlákenné struktury před inkubací
- Obrázek 14: Zkrystalizované soli. Snímky SEM

## SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1: Ideální vlastnosti scaffoldu pro tkáňové inženýrství
- Tabulka 2: Definice biodegradovatelnosti, biologické vstřebatelnosti, bioabsorbce a bioeroze
- Tabulka 3: Přehled použitých chemikálií
- Tabulka 4: Přehled použitých přístrojů
- Tabulka 5: Procesní podmínky netermální vakuové plazmatické úpravy
- Tabulka 6: Přehled inkubovaných scaffoldů
- Tabulka 7: Přehled inkubačních intervalů
- Tabulka 8: Porovnání průměrné plošné hmotnosti po ošetření netermálním plazmatem a bez ošetření
- Tabulka 9: Porovnání hydrofilicity u jednotlivých typů scaffoldů

## **SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1: Porovnání rychlosti objemového úbytku ve vybraných nádobách

Graf 2: Změny pH v závislosti na čase

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha I: Ukázky snímků SEM.

Příloha II: Histogramy

Příloha III: Hmotnostní změny.